

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 mars 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/15689 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷:
A61K 31/198, A61P 5/50

Ecole de Droit, F-34000 Montpellier (FR). SAUVAIRE, Yves [FR/FR]; 246 Chemin de la Qualité, F-34095 Montferrier sur Lez (FR). PAU, Bernard [FR/FR]; Le Mas Clos N° 6, Rue Sainte-Geneviève, F-34080 Montpellier (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02361

(22) Date de dépôt international: 23 août 2000 (23.08.2000)

(74) Mandataires: ARMENGAUD, Alain etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/10874 27 août 1999 (27.08.1999) FR

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cedex 07 (FR).

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): RIBES, Gérard [FR/FR]; 42 Route de Lavérune, F-34070 Montpellier (FR). TAOUIS, Mohammed [FR/FR]; 21 Allée Laurence Berluchon, F-37200 Tours (FR). PETIT, Pierre, Roger [FR/FR]; 8, Grand'rue Jean Moulin, F-34000 Montpellier (FR). BROCA, Christophe [FR/FR]; 20 Rue

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF AMINO ACIDS FOR MAKING MEDICINES FOR TREATING TO INSULIN-RESISTANCE

(54) Titre: UTILISATION D'ACIDES AMINES POUR LA FABRICATION DE MEDICAMENTS DESTINES AU TRAITEMENT DES INSULINO-RESISTANCES

(57) Abstract: The invention concerns the use of monohydroxy or polyhydroxy amino acids, and the lactone forms thereof for making medicines with insulin-analogue and/or insulin-sensitizing effects on peripheral tissues targeted by insulin, and more particularly the use thereof for making medicines for treating and preventing insulin-resistance.

(57) Abrégé: La présente invention est relative à l'utilisation d'acides aminés mono- ou polyhydroxylés, et de leurs formes lactoniques pour la fabrication de médicaments à effets insulino-mimétiques et/ou insulino-sensibilisateurs sur les tissus périphériques cibles de l'insuline, et plus particulièrement à leur utilisation pour la fabrication de médicaments destinés au traitement et à la prévention des insulino-résistances.

WO 01/15689 A1

BEST AVAILABLE COPY

**Utilisation d'acides aminés pour la fabrication de médicaments
destinés au traitement des insulino-résistances**

La présente demande est relative à l'utilisation d'acides aminés pour
5 la fabrication de médicaments à effets insulino-mimétiques et/ou insulino-
sensibilisateurs sur les tissus périphériques cibles de l'insuline, et plus
particulièrement à l'utilisation d'acides aminés pour la fabrication de
médicaments destinés au traitement et à la prévention des insulino-
résistances.

10 Ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans
la compréhension des mécanismes moléculaires de l'action de l'insuline.
Un schéma montrant les voies principales de transduction du signal
insulinique est donné sur la figure 1. Le récepteur de l'insuline est un
récepteur transmembranaire doué d'une activité tyrosine kinase intrinsèque
15 (Combettes-Souverain M. et Issad T., *Diab. Metab.*, 24, 477, 1998). La
liaison de l'insuline à son récepteur entraîne l'autophosphorylation du
récepteur sur ses résidus tyrosine, ce qui stimule son activité tyrosine
kinase envers un certain nombre de substrats intracellulaires tels que
Insulin Recepteur Substrate 1 (IRS-1), Insulin Recepteur Substrate 2 (IRS -
20 2) et Src homology collagen protein ou Shc. Cette activité tyrosine kinase
joue un rôle déterminant dans la transmission du signal insulinique, et elle
est altérée dans de nombreuses situations de résistance à l'insuline (Ricort
J.M. et coll., *Diabetologia*, 38, 1148, 1995). Globalement les mécanismes
cellulaires de l'insulino-résistance peuvent se situer au niveau de la liaison
25 de l'hormone à son récepteur ou à une étape plus distale de post-liaison au
récepteur. Comme le montre le schéma de la figure 1, la phosphorylation
sur les tyrosines des IRS et de Shc par le récepteur à l'insuline permet

l'activation de deux grandes voies de signalisation cellulaire, la voie des MAP kinases (MAPK) et la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K). La phosphotyrosine phosphatase (PTP) participe à la régulation de ces voies.

5 Les inventeurs ont précédemment rapporté l'effet insulino-sécréteur qui peut être exercé, au niveau des cellules pancréatiques, par des acides aminés hydroxylés extraits de graines de fenugrec (*Trigonella foenum graecum L.*), et en particulier par la 4-hydroxyisoleucine (4-OH-Ile) et/ou la lactone correspondante (brevets FR 2 695 317 et 2 745 718 et brevets
10 correspondants sous priorité).

Or, les inventeurs ont maintenant mis en évidence que de tels composés sont également capables d'agir au niveau des cellules cibles de l'insuline, à savoir les tissus périphériques tels que le foie et le muscle, en exerçant une action au niveau du récepteur à l'insuline et/ou de la cascade
15 de signalisation que l'activation de ce récepteur déclenche. L'effet observé au niveau de ces tissus périphériques correspond globalement à un effet insulino-mimétique ou insulino-sensibilisateur.

Les travaux réalisés, comme illustré par les exemples, ont en effet montré l'effet de ces composés au niveau de la cascade des
20 phosphorylations mise en jeu sous le récepteur, notamment l'augmentation de la phosphorylation des principales protéines impliquées dans la transmission du signal insulinique. L'activité PI 3-kinase (Phosphatidylinositol 3-kinase), enzyme activée par IRS-1 phosphorylée et jouant un rôle primordial dans la translocation du transporteur de glucose
25 GLUT 4, est également augmentée sous l'effet de tels composés. Dans les mêmes conditions d'utilisation de ces composés, l'activité phosphatase associée à la voie de signalisation du récepteur de l'insuline (activité PTP)

est abaissée, ce qui est cohérent avec l'augmentation des phosphorylations évoquée ci-dessus. Ces composés sont donc capables d'agir sur les voies de signalisation qui sont normalement enclenchées par l'insuline, que cela soit par activation des kinases, et/ou inhibition des phosphatases.

5 La présente demande a pour objet de tirer profit des résultats obtenus, et vise ainsi toute utilisation de tels acides aminés ou de leurs dérivés, à titre d'agent insulino-mimétique ou insulino-sensibilisateur. Elle vise notamment toute utilisation de tels composés pour la fabrication de médicaments à effets insulino-mimétiques et/ou insulino-sensibilisateurs.

10 Ces effets peuvent être observés au niveau des tissus périphériques cibles de l'insuline. Comme ces composés agissent sur les voies de signalisation qui sont normalement enclenchées par l'insuline, ils peuvent en effet servir de substituts, de compléments, de potentialisateur et de sensibilisateurs à l'insuline.

15 La présente demande vise ainsi l'utilisation, à titre d'agent insulino-mimétique ou insulino-sensibilisateur, de tout acide aminé ou dérivé d'acide aminé qui exerce une diminution de l'activité phosphatase PTP et/ou une augmentation de l'activité PI 3-kinase, d'un niveau équivalent, voire supérieur à la diminution, ou respectivement augmentation,

20 provoquée par l'insuline. Tout moyen permettant de constater un tel effet de diminution de l'activité PTP ou d'augmentation de l'activité PI 3-kinase est approprié. Les exemples qui suivent en donnent des illustrations.

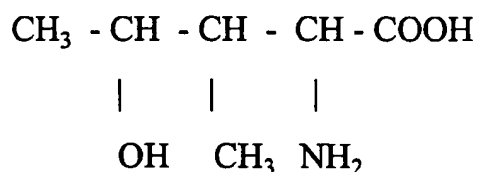
De tels composés correspondent de manière remarquable à des acides aminés qui ne reconnaissent pas le récepteur de l'insuline sur son

25 site de liaison, mais qui agissent au niveau post-récepteur, dans les conditions rapportées dans les exemples pour la 4-OH-Ile, et correspondent également aux dérivés de ces acides aminés qui ont

conservé, tout au moins en nature, les propriétés de non-reconnaissance du récepteur de l'insuline sur son site de liaison et d'activité au niveau post-récepteur que présente l'acide aminé parent dudit dérivé.

De manière avantageuse, l'utilisation selon l'invention est
5 caractérisée en ce qu'elle porte sur un composé choisi parmi le groupe constitué par les acides aminés mono-hydroxylés, les acides aminés poly-hydroxylés, et les formes lactoniques de ces acides aminés mono- ou poly-hydroxylés.

L'invention vise tout spécialement l'utilisation de la
10 4-hydroxyisoleucine de formule



et/ou de sa forme lactonique.

15 En particulier, l'invention vise l'utilisation de la 4-hydroxyisoleucine (4-OH-Ile en abrégé) sous la forme de son isomère 2S, 3R, 4S, ou de la lactone correspondante.

Compte tenu des effets observés, les médicaments fabriqués conformément à l'invention sont particulièrement appropriés pour traiter
20 les insulino-résistances, combattre ou prévenir les syndromes liés à l'insulino-résistance, et prévenir les insulino-résistances.

Or, on sait que la prise excessive de poids, la sédentarité, une alimentation mal équilibrée, le nombre de plus en plus important des personnes âgées sont des facteurs socio-économiques fréquemment
25 rencontrés dans les pays occidentaux. Tous concourent au développement d'une insulino-résistance et d'une hyperinsulinémie compensatoire, souvent associée à l'obésité et potentiellement diabétogène. Ainsi, les acides gras

libres sont parmi les premiers candidats avancés pour tenter d'expliquer l'étroite relation entre insulino-résistance, obésité et hyperinsulinisme (Mac Garry J.D., J. Cell. Biochem., 555, 29, 1994).

Cette relation prend de nos jours la dimension d'un phénomène
5 majeur sur le plan de la santé publique. Un faisceau de preuves, à la fois cliniques et épidémiologiques, liant l'hyperinsulinémie au risque de futures maladies cardio-vasculaires, risque athérogène ou diabétogène, a permis de dresser le tableau cohérent du syndrome X de Reaven (hyperinsulinémie, insulino-résistance, augmentation des triglycérides sériques, hypertension
10 artérielle) et des risques morbides qui lui sont associés (Reaven G.M., Diabetes, 37, 1595, 1988). De plus, selon de récentes enquêtes, l'hyperinsulinémie en favorisant la prolifération de certaines cellules épithéliales (notamment du colon) apparaît associée au risque de cancer (Hu F.B. et coll., J. Natl. Cancer Inst., 91, 542, 1999).

15 La présente demande vise ainsi toute utilisation desdits acides aminés et dérivés pour la fabrication d'un médicament destiné à lutter contre les insulino-résistances et les syndromes d'insulino-résistance, en particulier contre les hyperinsulinémies, l'insulino-résistance liée au vieillissement et contre des affections liées à l'obésité.

20 La présente demande vise également toute utilisation desdits acides aminés et dérivés pour la fabrication d'un médicament destiné à prévenir les insulino-résistances, et en particulier pour la fabrication d'un médicament destiné à diminuer le besoin en insuline exogène. De tels médicaments, du fait de leurs propriétés insulino-mimétiques et insulino-
25 sensibilisateurs, peuvent en effet avoir pour effet de diminuer le besoin en insuline exogène que présentent les patients dont l'insuline endogène est déficitaire, voire absente comme dans le cas du diabète de type 1. Les

patients atteints de diabète de type 1 souffrent en effet d'une absence totale de sécrétion d'insuline (destruction des cellules productrices) qui contraint à des apports exogènes complets d'insuline. Cette situation, outre le coût intrinsèque à de telles administrations, conduit souvent au développement d'insulino-résistances. Afin de prévenir et remédier à ces problèmes, la présente invention propose pour le traitement d'un déficit en insuline endogène, et en particulier d'une absence d'insuline endogène telle que le diabète de type 1, et pour la fabrication d'un médicament destiné à de tels traitements, d'utiliser au moins un desdits acides aminés ou dérivés.

Utilisés en combinaison avec l'insuline, ils présentent l'avantage de diminuer le besoin en insuline exogène du patient (diminution des apports en insuline nécessaires), et donc de diminuer les frais de traitement tout en prévenant le développement des insulino-résistances et de leurs effets secondaires.

Les médicaments fabriqués conformément à l'invention pourront être également utilisés pour contribuer à inhiber la prolifération de certaines lignées cellulaires associées au risque d'apparition de cancers.

L'invention vise encore l'utilisation desdits dérivés, en particulier de la 4-hydroxyisoleucine et/ou de sa forme lactonique pour fabriquer des médicaments qui agissent en diminuant l'activité phosphatase associée à la voie de signalisation du récepteur-insuline, et/ou en stimulant l'activité PI 3-kinase sur IRS-1 et/ou IRS-2.

La présente demande vise également toute composition pharmaceutique, tout kit pharmaceutique, et tout médicament comprenant, de manière combinée, de l'insuline et au moins un des composés acides aminés ou dérivés définis ci-dessus. Cette combinaison peut être physique (insuline et acide aminé ou dérivé sont alors dans une même composition).

Elle peut alternativement correspondre à une présentation de l'insuline d'une part, et de l'acide aminé ou dérivé d'autre part, dans des compositions physiquement distinctes, mais qui sont présentées comme associées pour une utilisation combinée (kit-of-parts). Cette utilisation combinée peut être
5 simultanée ou différée dans le temps.

Les médicaments selon l'invention peuvent être administrés par voie orale, essentiellement, mais aussi par voie intraveineuse ou intramusculaire, et renferment des excipients qui sont choisis en fonction de la forme galénique adoptée.

10 La posologie sera adaptée en fonction de la pathologie à traiter.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés, à titre illustratif, dans les exemples qui suivent dans lesquels il est fait référence aux figures 2 à 11 (on rappelle que la figure 1 a été évoquée ci-dessus et donne le schéma des voies principales de transduction du signal
15 insulinique), ces figures 2 à 11 représentant respectivement :

- la figure 2, l'effet de la 4-OH-Ile sur la phosphorylation du récepteur de l'insuline et de son substrat dans le foie de rat,
- la figure 3, l'effet de la 4-OH-Ile sur l'activité PI 3-kinase du foie,
- la figure 4, la liaison de l'insuline sur son récepteur dans la lignée
20 de cellules hépatiques LMH,
- les figures 5 à 11, l'effet de la 4-OH-Ile, respectivement sur,
 - . l'activité PI 3-kinase du muscle (figure 5),
 - . l'insulinémie et la glycémie basales du rat (figure 6),
 - . l'activité PI 3-kinase du foie (figure 7) et du muscle (figure 8) de rat
25 diabétique de type 2,
 - . l'activité PI 3-kinase du foie de rat Zucker obèse (fa/fa) (figure 9),

. l'activité PI 3-kinase associée au récepteur PDGF ou au récepteur insuline sur le foie de rat normal (figure 10), et

. l'activité phosphatase associée à IRS-1 au niveau du foie de rat normal (figure 11).

5 Mesure de l'activité PI 3-kinase

L'activité PI 3-kinase a été mesurée sur des immunoprécipitats réalisés avec l'anticorps anti-IRS-1. Ceci a permis de déterminer l'activité enzymatique associée à l'action de l'insuline et de la comparer à l'action induite par la 4-OH-Ile.

10 Protocole expérimental

Des rats normaux Wistar mâles (souche IFFA CREDO, France) ont reçu, par injection intrapéritonéale, soit de l'insuline ordinaire seule (100 U/kg) soit de la 4-OH-Ile seule (18 mg/kg), soit de l'insuline associée à la 4-OH-Ile aux mêmes posologies. Les rats témoins ont reçu par voie
15 intrapéritonéale du chlorure de sodium à 9 ‰. Quinze minutes après l'injection, les animaux ont été sacrifiés et les tissus périphériques (foie, muscle) immédiatement prélevés et congelés dans l'azote liquide.

Pour la détermination de l'activité PI 3-kinase, les tissus sont broyés dans un tampon contenant les inhibiteurs de protéases et phosphatases
20 ainsi qu'un agent solubilisateur (Triton), comme décrit par Taouis et coll., J. Biol. Chem., 269, 14912, 1994. Après solubilisation, les surnageants sont immunoprécipités avec l'anti-IRS-1 et l'activité PI 3-kinase est mesurée dans l'immunoprécipitat. En effet, la réaction est initiée par l'addition d'un substrat artificiel de l'enzyme : le phosphatidylinositol (PI)
25 et (³³P) gamma ATP. Le produit de la réaction est soumis à une chromatographie sur couche mince (TLC plate) et les niveaux de phosphorylation du PI sont mesurés par un phosphoimager STORM

(Molecular Dynamics). L'activité est exprimée en unité arbitraire donnée par l'appareil (conversion de la radioactivité en luminescence grâce à un faisceau laser).

Mesure de l'activité phosphatase associée à la voie de signalisation de l'insuline

L'activité phosphatase a été mesurée sur des immunoprécipitats réalisés avec l'anticorps anti-IRS-1 et anti-récepteur insuline.

Le protocole de solubilisation est le même que celui pour le PI 3-kinase selon la méthodologie décrite par Taouis et coll. (J. Biol. Chem., 269, 14912, 1994). Après immunoprécipitation, l'activité phosphatase a été mesurée selon la méthode rapportée par Chen. et coll. (J. Biol. Chem., 272, 8026, 1997).

EXEMPLE 1 : Comparaison des effets de l'insuline et de la 4-OH-Ile sur la phosphorylation du récepteur-insuline et de IRS-1 dans le foie de rats

normaux

Les résultats de la figure 2 montrent clairement que le traitement des animaux par une injection unique de 4-OH-Ile (200 µg/kg I.P.) induit l'activation du récepteur de l'insuline (RI) et de son substrat (IRS-1) *in vivo*. L'effet de la 4-OH-Ile (4OH) est comparable à celui de l'insuline (Ins).

Ces résultats démontrent les effets insulino-mimétiques de la 4-OH-Ile dans l'activation de la phosphorylation du récepteur-insuline et de IRS-1 dont les phosphorylations sont indispensables pour l'activation de protéines effectrices telles que la PI 3-kinase.

EXEMPLE 2 : Comparaison des effets de l'insuline et de la 4-OH-Ile sur l'activité PI 3-kinase du foie

Les résultats en histogrammes sont donnés sur la figure 3. Sur ce schéma, on observe que l'insuline mais aussi la 4-OH-Ile, seules, stimulent significativement ($p < 0,05$) l'activité PI 3-kinase hépatique. Lorsque les deux substances sont administrées ensemble, un effet plus important
5 apparaît.

Ces observations démontrent que la 4-OH-Ile possède des effets insulino-mimétiques au niveau du foie. De plus, l'effet plus important objectivé lorsque les deux substances sont injectées conjointement est en faveur de mécanismes d'activation synergiques.

10 Ceci est confirmé par l'étude comparative des effets de l'insuline et de la 4-hydroxyisoleucine sur le récepteur membranaire à l'insuline de l'hépatocyte: la 4-hydroxyisoleucine n'a aucune liaison avec ce récepteur. On rapporte sur la figure 4 les résultats comparatifs concernant les liaisons de l'isoleucine et de la 4-OH-Ile. Les cellules LMH utilisées dans ces
15 essais sont issues d'un hépatocarcinome de poulet (Kawaguchi T. et coll., Cancer Res., 47, 4460, 1987).

EXEMPLE 3 : Comparaison des effets de l'insuline et de la 4-OH-Ile sur l'activité PI 3-kinase du muscle

Les résultats en histogrammes sont reportés sur la figure 5. Sur ce
20 schéma, on note que non seulement l'insuline stimule clairement l'activité PI 3-kinase, mais aussi que la 4-OH-Ile a un effet comparable. Ainsi, les effets insulino-mimétiques de la 4-OH-Ile observés au niveau hépatique sont confirmés au niveau musculaire.

On constate donc à l'examen des résultats des exemples 1 et 2 qu'au niveau
25 du foie et du muscle, la 4-hydroxyisoleucine stimule indépendamment de l'insuline la voie IRS-1/PI 3-kinase qui est la voie majeure dans le contrôle des actions métaboliques et mitogéniques de l'insuline. De plus, la 4-

hydroxyisoleucine ne reconnaît pas le récepteur de l'insuline ou du moins ne rentre pas en compétition avec l'insuline pour la liaison sur le récepteur.

EXEMPLE 4

L'effet bénéfique de la 4-hydroxyisoleucine contre une relative
5 hyperinsulinémie a été recherché *in vivo* lors de l'administration chronique
(pendant un mois) de l'acide aminé végétal (25 mg/kg/jour, par voie
intrapéritonéale) sur le rat rendu diabétique non insulino-dépendant
(diabète de type 2) par les injections conjointes de nicotinamide et de
streptozotocine (Masiello et coll., Diabetes, 47, 224, 1998). Des prises de
10 sang régulières effectuées sur la veine caudale des rats ont permis d'évaluer
par méthode radio-immunologique (Herbert et coll., J. Clin. Endocr., 25,
1375, 1965) le taux d'insuline plasmatique, 15 heures après l'injection du
produit qui avait lieu à 17 h 30. Sur ces mêmes prélèvements, le taux
plasmatique de glucose a été dosé par méthode enzymatique (Trinder P., J.
15 Clin. Pathol. 22, 158, 1969).

Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 6.

On observe que l'administration quotidienne de 4-hydroxyisoleucine a
pour effet d'abaisser significativement ($p < 0,05$) l'insulinémie des animaux
traités.

20 De plus, après l'arrêt du traitement, on peut constater que l'insuline
plasmatique s'élève à nouveau pour rejoindre des valeurs proches de celles
observées avant le traitement. Dans ces conditions, une légère diminution
de la glycémie a été observée en fin de traitement.

L'abaissement de l'insulinémie observée chez le rat après un traitement
25 chronique par la 4- hydroxyisoleucine confirme *in vivo* les effets insulino-
mimétiques et/ou insulino-sensibilisateurs observés lors des expériences *in*
vitro.

EXEMPLE 5 : Comparaison des effets de l'insuline et de ceux de la 4-OH-Ile sur l'activité PI 3-kinase du muscle et du foie prélevés chez le rat diabétique de type 2 (Masiello et coll., Diabetes 47, 224, 1998)

Les résultats en histogrammes sont reportés sur les figures 7 et 8. On note que, si l'insuline active la PI 3-kinase hépatique (figure 7) et musculaire (figure 8), il en est de même pour la 4-OH-Ile. La 4-OH-Ile dans cette situation pathologique induit le même effet que l'insuline avec la même intensité.

De plus, on constate que la 4-OH-Ile stimule significativement la voie

IRS-1/PI 3-kinase plus nettement dans le muscle ($p < 0,01$) que dans le foie ($p < 0,05$).

EXEMPLE 6

Lors de l'administration chronique pendant 4 semaines de la 4-OH-Ile (50 mg/kg par voie intrapéritonéale) chez le rat Zucker obèse (*fa/fa*), l'activité PI 3-kinase du foie a été mesurée en fin de traitement. Les résultats en histogrammes sont reportés sur la figure 9. Ils montrent que l'activité basale de la PI 3-kinase (animaux sacrifiés 17 heures après la dernière administration de 4-OH-Ile) est augmentée chez les animaux traités.

EXEMPLE 7

La 4-OH-Ile active la PI 3-kinase associée au récepteur de l'insuline mais pas celle associée au récepteur PDGF (Platelet Derived Growth Factor).

Les activités PI 3-kinase du récepteur PDGF et du récepteur-insuline en présence ou en l'absence de 4-OH-Ile (18 mg/kg I.P.) ont été comparées suivant le protocole déjà décrit.

Les résultats en histogrammes sont reportés sur la figure 10: ils démontrent clairement la spécificité de la voie d'action de la 4-OH-Ile au niveau du

foie de rat, c'est-à-dire que l'activité de la PI 3-kinase associée au récepteur-insuline est la seule augmentée ($p < 0,05$).

EXEMPLE 8 : Effet de la 4-OH-Ile sur l'activité phosphatase associée à la voie de signalisation du récepteur-insuline

5 Dans le but de mieux situer le site d'action de la 4-OH-Ile, son impact sur l'activité phosphatase a été étudié. L'activité phosphatase associée à IRS-1 a été mesurée.

La figure 11 montre que la 4-OH-Ile (200 $\mu\text{mol/l}$) inhibe significativement ($p < 0,05$) cette activité au niveau du foie de rat normal.

10 EXEMPLE 9

Un médicament selon l'invention est particulièrement adapté au traitement symptomatique des états d'insulino-résistance, notamment des états d'insulino-résistance avec obésité. Il peut être préparé à partir d'un acide aminé mono- ou polyhydroxylé et/ou ses formes lactoniques à l'aide
15 de toute technique appropriée connue de l'homme du métier. Il peut être notamment réalisé à partir de 4- hydroxyisoleucine. Ce produit étant hydrosoluble, un tel médicament peut être aisément réalisé sous forme de solution (dans du sérum physiologique par exemple), ou sous forme galénique solide telle que comprimé ou gélule. Les pathologies visées étant
20 chroniques, l'administration par voie orale apparaît plus adaptée. De tels médicaments peuvent ainsi être aisément administrés à des posologies pluri-quotidiennes, adaptées au cas particulier du patient concerné, par exemple de l'ordre de 2 à 3 prises par jour. Un médicament selon l'invention peut également comprendre de l'insuline.

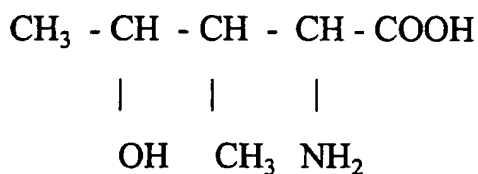
REVENDICATIONS

1) Utilisation d'un composé choisi parmi le groupe constitué par les acides aminés mono-hydroxylés, les acides aminés poly-hydroxylés, et les formes lactoniques de ces acides, pour la fabrication d'un médicament à effets insulino-mimétiques et/ou insulino-sensibilisateurs.

2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à exercer un effet insulino-mimétique et/ou insulino-sensibilisateur au niveau des tissus périphériques cibles de l'insuline.

3) Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit composé diminue l'activité phosphatase associée à la voie de signalisation du récepteur de l'insuline, et/ou stimule l'activité PI 3-kinase sur IRS-1 et/ou IRS-2.

4) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit composé est la 4-hydroxyisoleucine de formule



et/ou la forme lactonique de cet acide aminé.

5) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que la 4-hydroxyisoleucine se présente sous la forme de son isomère 2S, 3R, 4S ou de la lactone correspondante.

6) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des insulino-résistances.

7) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour la fabrication d'un médicament destiné à lutter contre les syndromes liés à l'insulino-résistance.

8) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la fabrication d'un médicament contre les hyperinsulinémies.

9) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la fabrication d'un médicament contre l'insulino-résistance liée au vieillissement.

10) Utilisation l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la fabrication d'un médicament contre les affections liées à l'obésité.

11) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la fabrication d'un médicament destiné à inhiber la prolifération de lignées cellulaires associées au risque d'apparition de cancers.

12) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention des insulino-résistances.

13) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1-5, et 12, pour la fabrication d'un médicament destiné à diminuer le besoin en insuline exogène.

14) Composition ou kit pharmaceutique comprenant à la fois de l'insuline et un composé choisi parmi le groupe constitué par les acides aminés mono-hydroxylés, les acides aminés poly-hydroxylés, et les formes lactoniques de ces acides.

Figure 1

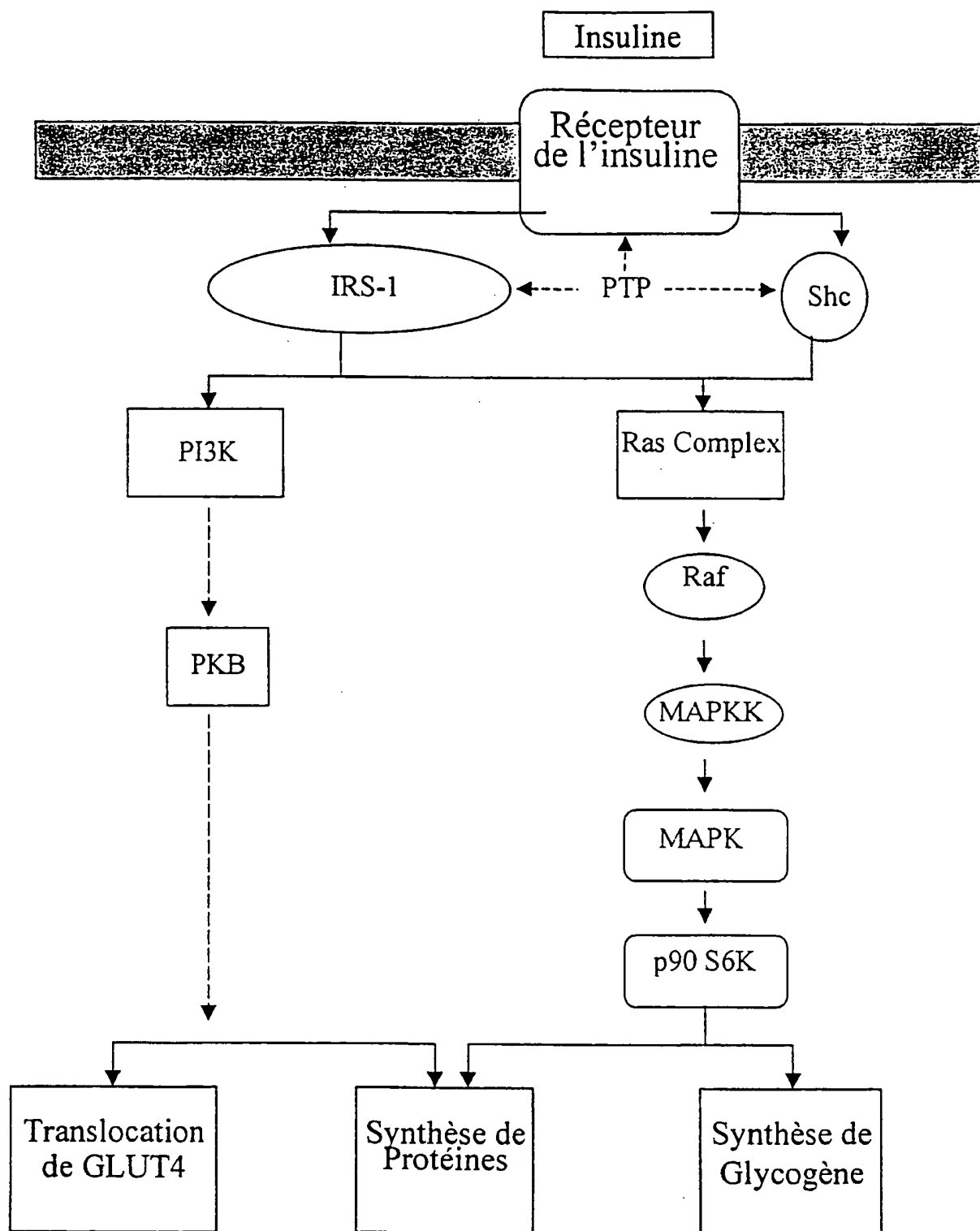


Figure 2

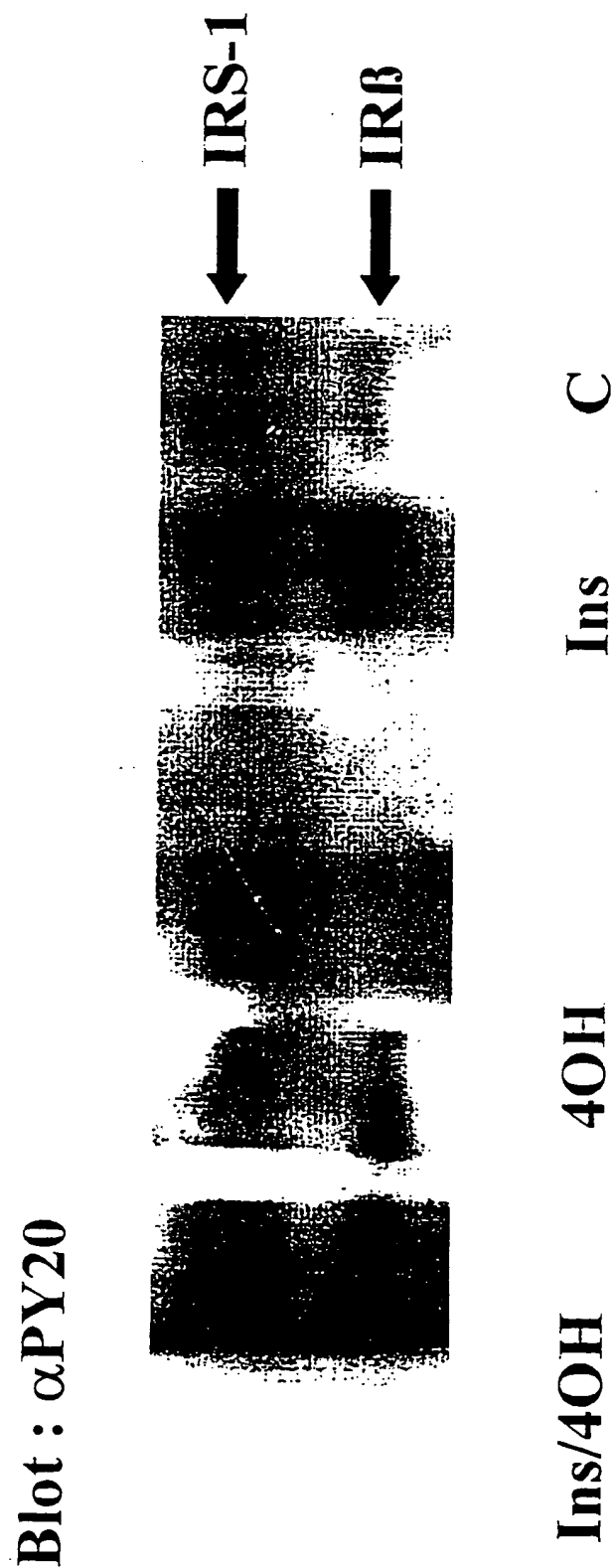


Figure 3

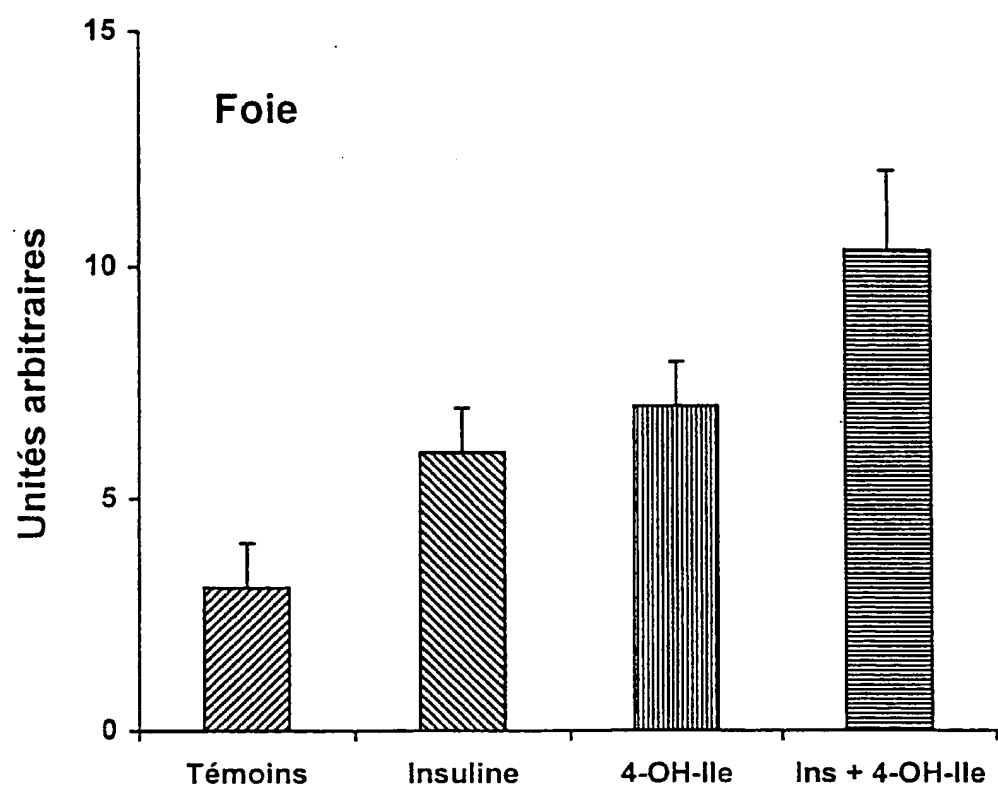


Figure 4

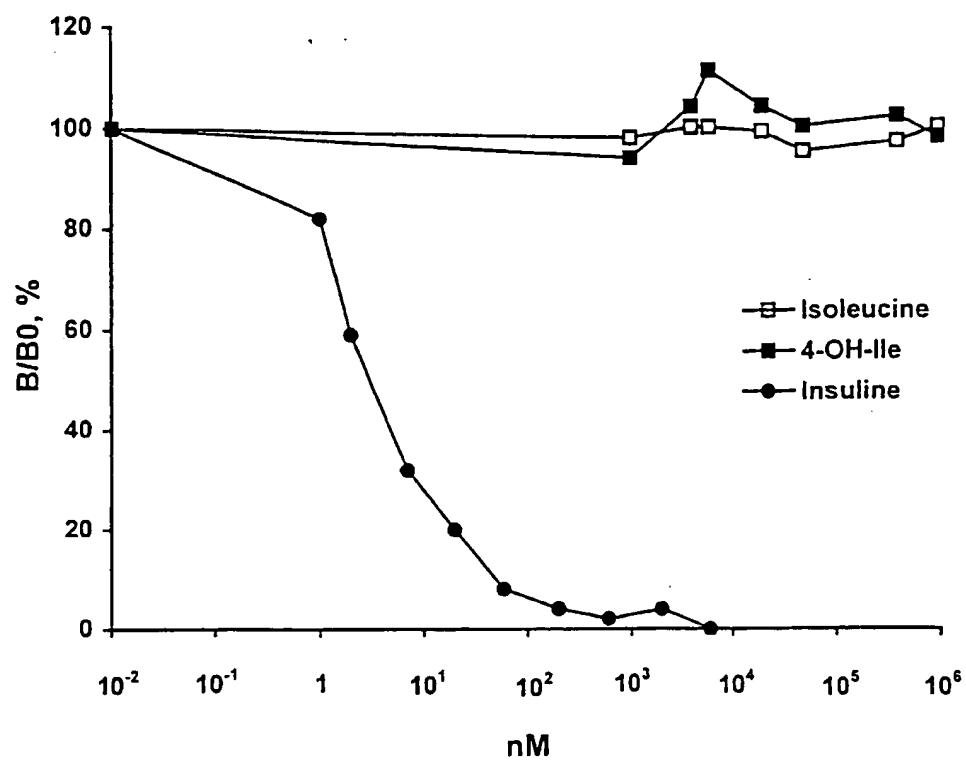


Figure 5

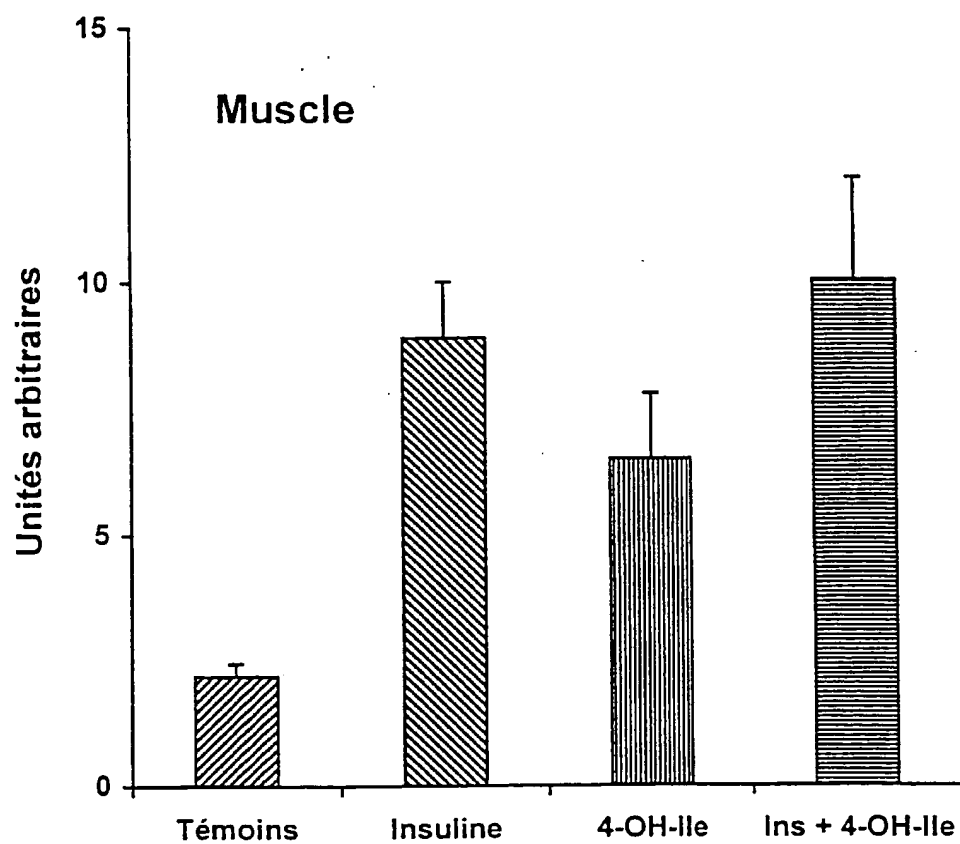


FIGURE 6

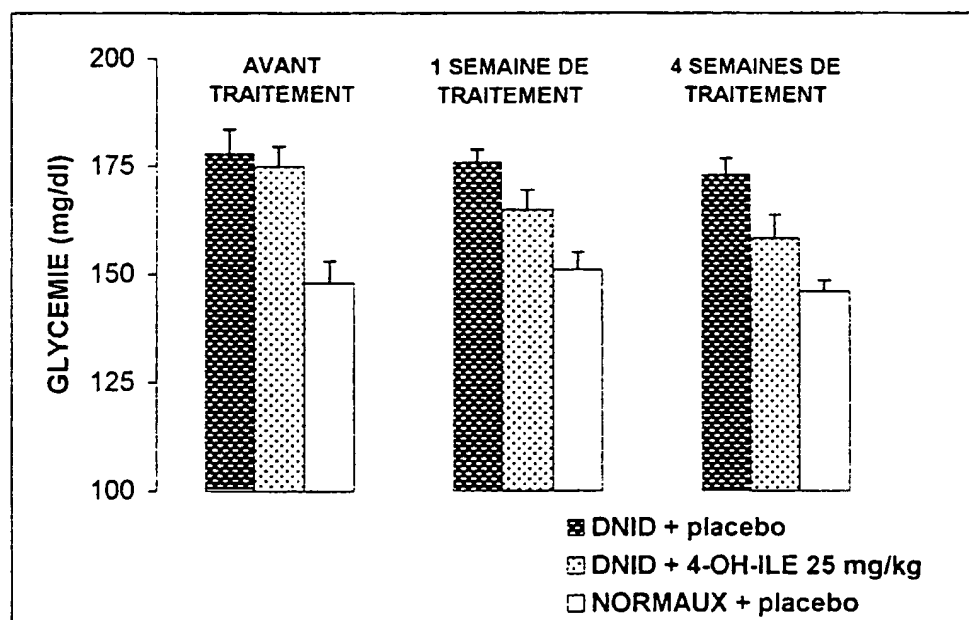
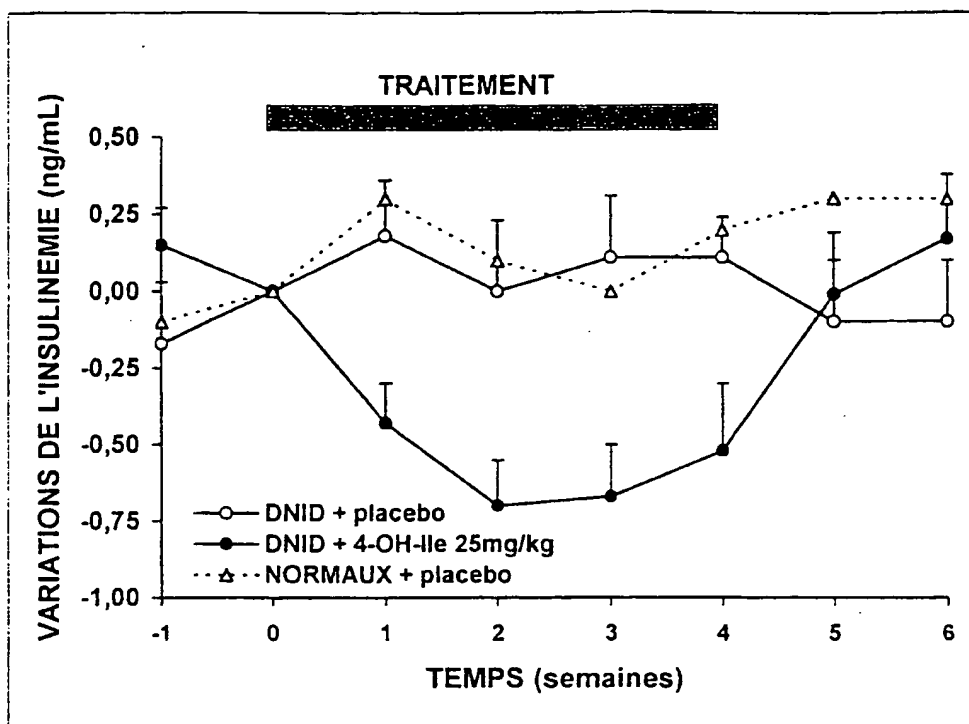


Figure 7

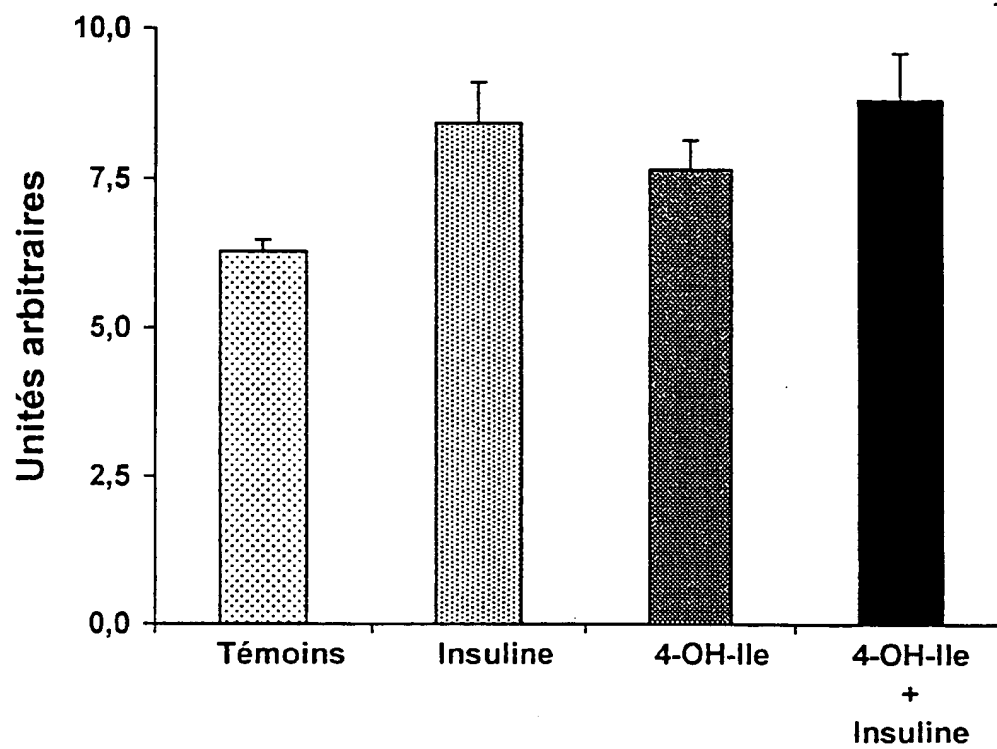


Figure 8

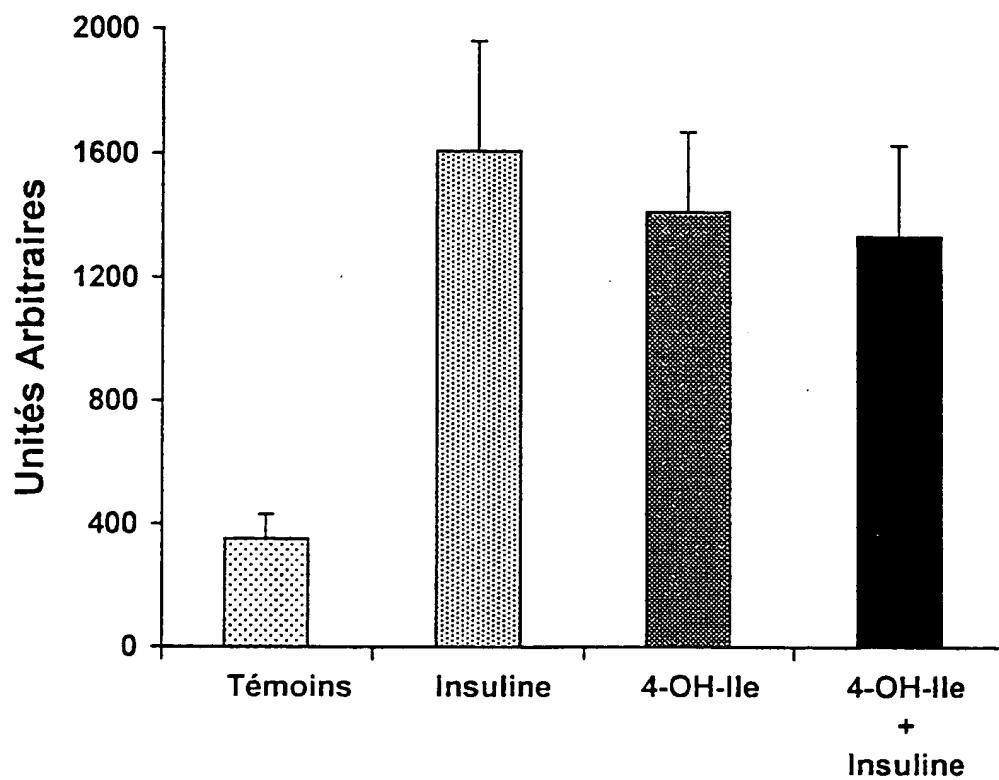


Figure 9

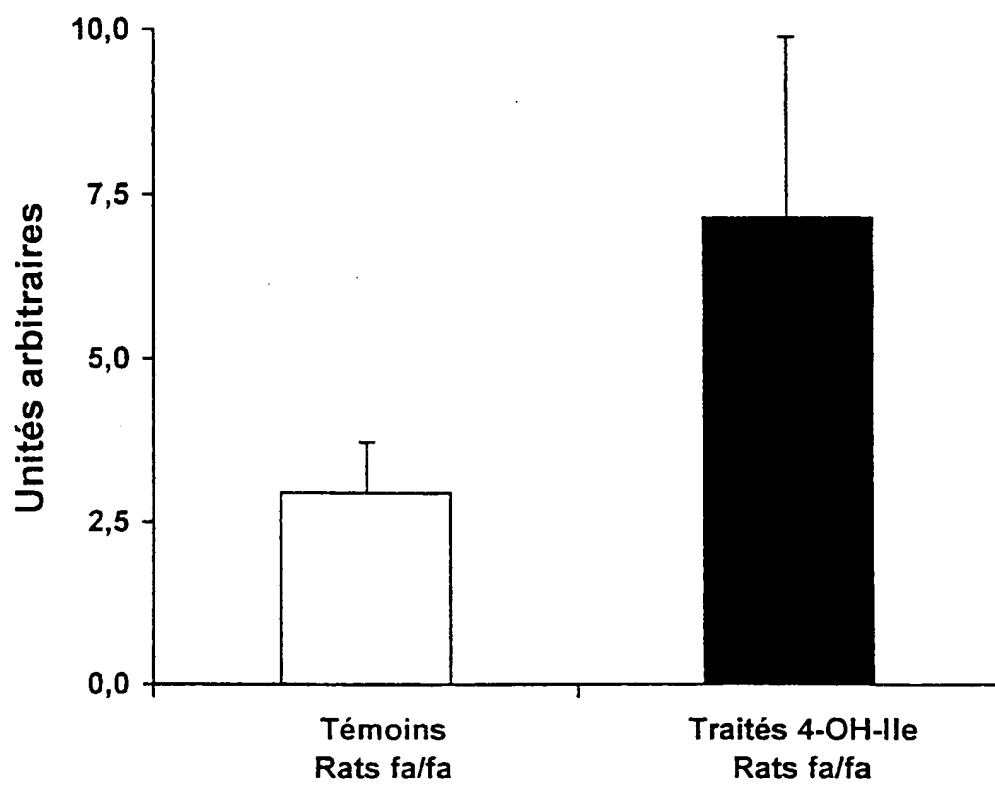


Figure 10

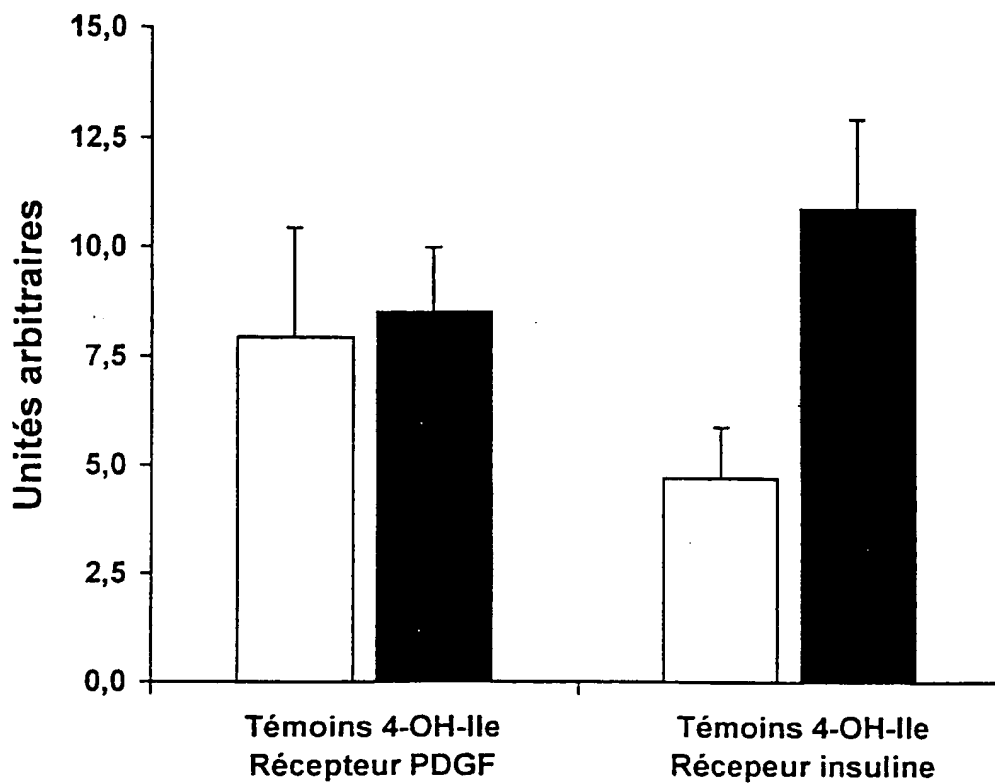
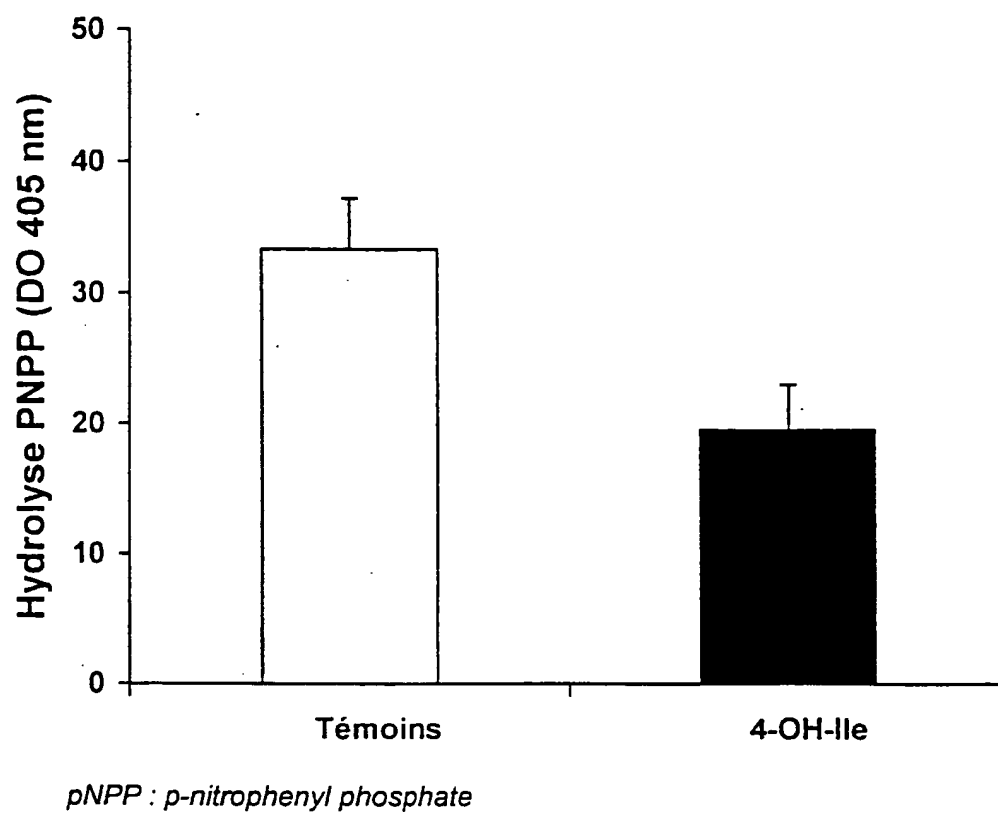


Figure 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/FR 00/02361

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/198 A61P5/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 745 718 A (GESTION JOUVENET SOC CIV DE) 12 September 1997 (1997-09-12) cited in the application page 1, line 23,24	1-10,12, 13
X	figure 2 claims	14
X	FR 2 695 317 A (MONAL LAB) 11 March 1994 (1994-03-11) cited in the application page 1, line 27 claims	1-10,12, 13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 December 2000

Date of mailing of the international search report

15/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Veronese, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02361

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BROCA, C. (1) ET AL: "Intracellular signalling and 4- hydroxyisoleucine insulinotropic effect." DIABETOLOGIA, (AUG., 1999) VOL. 42, NO. SUPPL. 1, PP. A129. MEETING INFO.: 35TH ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES BRUSSELS, BELGIUM SEPTEMBER 28-OCTOBER 2, 1999 EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES., XP000910386 abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10,12,13
T	<p>BROCA, CHRISTOPHE (1) ET AL: "4-Hydroxyisoleucine: Experimental evidence of its insulinotropic and antidiabetic properties." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, (OCT., 1999) VOL. 277, NO. 4 PART 1, PP. E617-E623., XP000908984 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10,12,13
X	<p>BROCA, C. (1) ET AL: "4-Hydroxyisoleucine improves glucose tolerance in normal and NIDDM animals." DIABETOLOGIA, (AUG., 1998) VOL. 41, NO. SUPPL. 1, PP. A239. MEETING INFO.: 34TH ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES BARCELONA, SPAIN SEPTEMBER 11, 1998 EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES., XP000908999 abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10,12,13
A	<p>RICORT J M ET AL: "Alterations in insulin signalling pathway induced by prolonged insulin treatment of 3T3-L1 adipocytes." DIABETOLOGIA, (1995 OCT) 38 (10) 1148-56., XP000909007 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-12
A	<p>WO 98 32017 A (TERRAPIN TECH INC) 23 July 1998 (1998-07-23) the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3
A	<p>WO 98 21592 A (RONDINONE CHRISTINA M ;SMITH ULF (SE); RECEPTON CORP (US)) 22 May 1998 (1998-05-22) claims</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/FR 00/02361

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WITHERS DJ ET AL: "Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, vol. 391, no. 6670, 26 February 1998 (1998-02-26), pages 900-904, XP002119312 ISSN: 0028-0836 the whole document</p>	3
A	<p>WO 96 18313 A (UNIV NOTTINGHAM ; GREENHAFF PAUL LEONARD (GB); GREEN ALLISON LESLEY) 20 June 1996 (1996-06-20) page 8, line 5-11 page 22, line 7-18 claims 23, 24</p>	14
A	<p>US 5 591 709 A (LINDENBAUM ELLA) 7 January 1997 (1997-01-07) claims 2, 21</p>	14

Continuation of Box I.2

The definition "insulin-analog and/or insulin sensitizing" mentioned in Claims 1 and 2 does not define the diseases for which the composition are intended. Likewise, the definition "characterised in that the compound reduces the phosphatase activity associated with the path signalling the insulin receptor and/or stimulates the PI-3 kinase and/or IRS-2 activity" does not define the diseases for which the compositions are intended.

In the present context, the claims are so lacking in support basis and the disclosure of the invention is so limited that it is not possible to carry out any meaningful search covering the whole claimed spectrum. Consequently, the search was limited to those parts of the claims which are supported and disclosed, that is the parts concerning monohydroxylated amino acid, the polyhydroxylated amino acids, for the treatment of diseases mentioned in Claims 6-13.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the line of conduct adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examining Authority is not to proceed with a preliminary examination on a subject in respect of which no search has been carried out. This attitude will remain unchanged, notwithstanding whether the claims have been modified or not, either after the search report has been received, or during any procedure under Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02361

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2745718 A	12-09-1997	AU 2031997 A WO 9732577 A	22-09-1997 12-09-1997
FR 2695317 A	11-03-1994	AT 164064 T CA 2105502 A DE 69317494 D DE 69317494 T DK 587476 T EP 0587476 A ES 2116421 T JP 2655044 B JP 6157302 A US 5470879 A	15-04-1998 08-03-1994 23-04-1998 05-11-1998 07-12-1998 16-03-1994 16-07-1998 17-09-1997 03-06-1994 28-11-1995
WO 9832017 A	23-07-1998	US 5851988 A US 5830918 A AU 6026698 A EP 0960335 A	22-12-1998 03-11-1998 07-08-1998 01-12-1999
WO 9821592 A	22-05-1998	AU 7181198 A	03-06-1998
WO 9618313 A	20-06-1996	AT 194462 T AU 4185696 A CA 2208047 A DE 69518008 D EP 0798971 A US 5968900 A	15-07-2000 03-07-1996 20-06-1996 17-08-2000 08-10-1997 19-10-1999
US 5591709 A	07-01-1997	US 5461030 A AT 186840 T AU 670413 B AU 2587992 A BR 9206433 A CA 2116549 A DE 69230344 D DE 69230344 T EP 0650366 A FI 940932 A HU 67319 A JP 6510453 T NO 940406 A WO 9304691 A	24-10-1995 15-12-1999 18-07-1996 05-04-1993 27-09-1994 18-03-1993 30-12-1999 13-04-2000 03-05-1995 28-02-1994 28-03-1995 24-11-1994 28-03-1994 18-03-1993

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema. Internationale No

PCT/FR 00/02361

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K31/198 A61P5/50

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 745 718 A (GESTION JOUVENET SOC CIV DE) 12 septembre 1997 (1997-09-12) cité dans la demande page 1, ligne 23,24	1-10,12,13
X	figure 2 revendications	14
X	FR 2 695 317 A (MONAL LAB) 11 mars 1994 (1994-03-11) cité dans la demande page 1, ligne 27 revendications	1-10,12,13
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

G document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Veronese, A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BROCA, C. (1) ET AL: "Intracellular signalling and 4- hydroxyisoleucine insulintropic effect." DIABETOLOGIA, (AUG., 1999) VOL. 42, NO. SUPPL. 1, PP. A129. MEETING INFO.: 35TH ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES BRUSSELS, BELGIUM SEPTEMBER 28-OCTOBER 2, 1999 EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES., XP000910386 abrégé	1-10,12, 13
T	--- BROCA, CHRISTOPHE (1) ET AL: "4-Hydroxyisoleucine: Experimental evidence of its insulintropic and antidiabetic properties." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, (OCT., 1999) VOL. 277, NO. 4 PART 1, PP. E617-E623., XP000908984 le document en entier	1-10,12, 13
X	--- BROCA, C. (1) ET AL: "4-Hydroxyisoleucine improves glucose tolerance in normal and NIDDM animals." DIABETOLOGIA, (AUG., 1998) VOL. 41, NO. SUPPL. 1, PP. A239. MEETING INFO.: 34TH ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES BARCELONA, SPAIN SEPTEMBER 11, 1998 EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES., XP000908999 abrégé	1-10,12, 13
A	--- RICORT J M ET AL: "Alterations in insulin signalling pathway induced by prolonged insulin treatment of 3T3-L1 adipocytes." DIABETOLOGIA, (1995 OCT) 38 (10) 1148-56., XP000909007 le document en entier	1-12
A	--- WO 98 32017 A (TERRAPIN TECH INC) 23 juillet 1998 (1998-07-23) le document en entier	3
A	--- WO 98 21592 A (RONDINONE CHRISTINA M ;SMITH ULF (SE); RECEPTRON CORP (US)) 22 mai 1998 (1998-05-22) revendications	3
	--- -/-	

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WITHERS DJ ET AL: "Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, vol. 391, no. 6670, 26 février 1998 (1998-02-26), pages 900-904, XP002119312 ISSN: 0028-0836 le document en entier	3
A	WO 96 18313 A (UNIV NOTTINGHAM ; GREENHAFF PAUL LEONARD (GB); GREEN ALLISON LESLEY) 20 juin 1996 (1996-06-20) page 8, ligne 5-11 page 22, ligne 7-18 revendications 23,24	14
A	US 5 591 709 A (LINDENBAUM ELLA) 7 janvier 1997 (1997-01-07) revendications 2,21	14

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

La définition "effet insulino-mimétiques et /ou insulino-sensibilisateurs" présente dans la revendication 1 et 2 ne définit pas les maladies pour lesquelles les compositions sont destinées. Aussi la définition "caractérisée en ce que ledit composé diminue l'activité phosphatase associée à la voie de signalisation du récepteur de l'insuline, et /ou stimule l'activité PI 3-kinase sur IRS-1 et/ou IRS-2 ne définit pas les maladies pour lesquelles les compositions sont destinées.

Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux acide aminé monohydroxylé, les acides aminé poly-hydroxylé, pour le traitement des maladies mentionnées dans les revendications 6-13.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. .e Internationale No

PCT/FR 00/02361

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2745718 A	12-09-1997	AU 2031997 A WO 9732577 A	22-09-1997 12-09-1997
FR 2695317 A	11-03-1994	AT 164064 T CA 2105502 A DE 69317494 D DE 69317494 T DK 587476 T EP 0587476 A ES 2116421 T JP 2655044 B JP 6157302 A US 5470879 A	15-04-1998 08-03-1994 23-04-1998 05-11-1998 07-12-1998 16-03-1994 16-07-1998 17-09-1997 03-06-1994 28-11-1995
WO 9832017 A	23-07-1998	US 5851988 A US 5830918 A AU 6026698 A EP 0960335 A	22-12-1998 03-11-1998 07-08-1998 01-12-1999
WO 9821592 A	22-05-1998	AU 7181198 A	03-06-1998
WO 9618313 A	20-06-1996	AT 194462 T AU 4185696 A CA 2208047 A DE 69518008 D EP 0798971 A US 5968900 A	15-07-2000 03-07-1996 20-06-1996 17-08-2000 08-10-1997 19-10-1999
US 5591709 A	07-01-1997	US 5461030 A AT 186840 T AU 670413 B AU 2587992 A BR 9206433 A CA 2116549 A DE 69230344 D DE 69230344 T EP 0650366 A FI 940932 A HU 67319 A JP 6510453 T NO 940406 A WO 9304691 A	24-10-1995 15-12-1999 18-07-1996 05-04-1993 27-09-1994 18-03-1993 30-12-1999 13-04-2000 03-05-1995 28-02-1994 28-03-1995 24-11-1994 28-03-1994 18-03-1993

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.